

# The role of dairy products and constituents in metabolic risk management

Citation for published version (APA):

van Meijl, L. E. C. (2010). *The role of dairy products and constituents in metabolic risk management*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. <https://doi.org/10.26481/dis.20101217lm>

## Document status and date:

Published: 01/01/2010

## DOI:

[10.26481/dis.20101217lm](https://doi.org/10.26481/dis.20101217lm)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## SUMMARY

The metabolic syndrome, a constellation of metabolic disturbances, strongly enhances the risk of cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus. It is characterized by abnormalities in a wide variety of metabolic risk markers, including abdominal obesity, hypertension, atherogenic dyslipidemia, insulin resistance, and a prothrombotic and proinflammatory state. Although the aetiology of the metabolic syndrome has not been fully established, it is clear that obesity, insulin resistance, and environmental factors, such as diet, are major players in its development. Dietary changes are important for its prevention and a special role has been suggested for dairy products. Numerous observational studies have shown a negative association between dairy intake and the metabolic syndrome or its components, but intervention studies on the metabolic effects of dairy consumption are scarce. In **chapter 2**, an overview of literature on the physiological effects of three main dairy constituents (calcium, protein, and fat) on components of the metabolic syndrome, as well as the possible mechanisms involved, is given. Calcium supplements improve the serum lipoprotein profile and reduce blood pressure. Effects of calcium may be related to intestinal binding to fatty acids or bile acids, or to changes in intracellular calcium metabolism by suppressing calciotropic hormones. Dietary proteins may play a role in body weight regulation. Further, dairy proteins are precursors of ACE-inhibitory peptides, which may lower blood pressure, but such effects have inconsistently been reported in human studies. Finally, CLA, which effectively lowers body weight in animals, has no such effect in humans in the quantities provided by dairy products.

This thesis further describes the results of human intervention studies and *in vitro* experiments addressing the effects of dairy products or its constituents on several metabolic disturbances associated with the metabolic syndrome. In our first trial, described in **chapters 3 and 4**, we studied the effects of low-fat dairy consumption on metabolic risk parameters in overweight and obese subjects. Thirty-five overweight, but otherwise healthy, subjects consumed 500 mL of low-fat milk and 150 g of low-fat yogurt, or 600 mL of fruit juice and 3 fruit biscuits per day for 8 weeks, in randomized order. Compared with the control period, the decrease in plasma 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> concentrations after the low-fat dairy period confirmed dietary compliance. Systolic blood pressure was decreased by 2.9 mmHg after dairy consumption compared with control, while the difference in diastolic blood pressure did not reach statistical significance. Further, low-fat dairy consumption decreased HDL-cholesterol and apoA-1 concentrations. Serum total cholesterol, LDL-cholesterol, apoB, TAG, FFA, glucose, insulin, CRP and PAI-1 were unchanged. We also investigated the effects of dairy consumption on a range of inflammatory markers and adhesion molecules. Dairy consumption affected the TNF- $\alpha$  pathway by increasing s-TNFR-2 concentrations, while we observed a trend towards increased s-TNFR-1 and decreased TNF- $\alpha$  concentrations. The physiological consequences of these last observations are not clear. Overall, we concluded that 8

weeks of dairy consumption decreased systolic blood pressure, but did not have beneficial effects on other metabolic risk markers in overweight subjects.

Besides the longer-term effects, we were also interested in the short-term postprandial effects of dairy products. Postprandial hyperlipidemia and hyperglycemia have been considered as risk factors for CVD. Managing these factors may be an alternative strategy to reduce CVD risk, as people in Western countries are in the postprandial state for most of the day. Postprandial hyperlipidemia and hyperglycemia are frequently seen in subjects with the metabolic syndrome. In this postprandial study, we investigated the effects of the addition of milk, and the milk constituents protein and calcium, to a high-fat meal, which is described in **chapter 5**. Sixteen overweight, but otherwise healthy, subjects participated in 4 postprandial tests, in which they consumed a high-fat breakfast and 500 mL of a control, calcium, protein or milk drink. The results of this study showed that milk and protein increased the postprandial TAG response after a high-fat mixed meal. Further, milk and protein ingestion reduced the maximal increase in glucose concentration. Plasma FFA were unchanged, although insulin concentrations were elevated after the milk meal. Calcium did not have effects on postprandial responses. So, addition of low-fat milk to a mixed meal has ambiguous effects on postprandial metabolic risk profiles in overweight subjects, as it decreased glucose concentrations but increased TAG concentrations.

In our *in vitro* experiments, described in **chapter 6**, we investigated the effects of the amino acids glutamine, leucine and proline on inflammation and insulin sensitivity in HepG2 liver cells. Cells were treated with IL-1 $\beta$  to induce an inflammatory response. Incubation with amino acids reduced the production of the pro-inflammatory cytokine IL-8 and the activity of the transcription factor NF- $\kappa$ B. To study the effects of amino acids on insulin sensitivity, cells were incubated with TNF- $\alpha$  to induce a situation of insulin resistance. The phosphorylation of Akt, which is induced by insulin stimulation, was inhibited by TNF- $\alpha$  treatment. However, addition of glutamine, leucine, or proline to the culture media restored Akt phosphorylation in the situation of decreased insulin sensitivity. Although these results seem promising, further research is needed to explore the role of amino acids on inflammatory processes and insulin signaling in the *in vivo* situation.

Taken together, the results presented in this thesis do not fully explain the findings from observational research, which indicated a negative relation between dairy intake and the metabolic syndrome. Our first intervention study showed a beneficial reduction in systolic blood pressure, but also a reduction in HDL-cholesterol after daily consumption of 500 mL low-fat milk and 150 g low-fat yogurt for 8 weeks. Further, dairy consumption seemed to influence the TNF- $\alpha$  pathway. Our *in vitro* experiments suggested a beneficial role for amino acids in insulin sensitivity, but this could not be concluded from glucose and insulin concentrations in fasting plasma samples from our 8-week intervention study. Our acute postprandial study did

## SUMMARY

however show that low-fat milk, consumed with a high-fat meal, reduced the postprandial rise in plasma glucose. At the same time, however, it increased the insulin and triglyceride response postprandially. The protein fraction of the milk seemed to be mainly accountable for these effects. Future studies should reveal to what extent the observed effects can be translated to other forms of dairy products, to other quantities, or to other populations.

## **SAMENVATTING**

Het metabool syndroom, een combinatie van verschillende metabole stoornissen, verhoogt het risico op hart- en vaatziekten en type 2 diabetes. Het wordt gekenmerkt door diverse metabole risicofactoren, zoals abdominale obesitas, hypertensie, atherogene dyslipidemie, insulineresistentie, chronische inflammatie, en een verhoogde stollingsneiging. Hoewel de exacte oorzaak van het metabool syndroom onbekend is, is het wel duidelijk dat overgewicht, insulineresistentie en omgevingsfactoren zoals voeding, een belangrijke rol spelen bij het ontstaan ervan. Gezonde eetgewoonten zijn belangrijk bij het voorkomen van het metabool syndroom en een speciale rol lijkt te zijn weggelegd voor zuivelproducten. Verschillende observationele studies hebben aangetoond dat er een negatieve relatie bestaat tussen zuivelconsumptie en (kenmerken van) het metabool syndroom. Interventiestudies op dit gebied zijn er echter nauwelijks.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van studies naar de fysiologische effecten van drie belangrijke zuivelbestanddelen (calcium, eiwit en vet) op kenmerken van het metabool syndroom en de mogelijke achterliggende mechanismen. Calciumsupplementen verbeteren het serum lipoproteïnenprofiel en verlagen de bloeddruk. De effecten van calcium zouden te maken kunnen hebben met de binding van vetzuren of galzouten in de darm, of met het onderdrukken van de werking van calciotrope hormonen. Eiwitten in de voeding lijken een rol te spelen in de regulatie van lichaamsgewicht. Verder hebben peptiden gevormd uit melkeiwitten een remmende werking op ACE, maar effecten op de bloeddruk zijn nog niet eenduidig aangetoond in mensen. Geconjugeerd linolzuur (CLA), tenslotte, verlaagt het lichaamsgewicht in proefdieren, maar in de hoeveelheden aanwezig in zuivelproducten lijkt het geen effect te hebben bij mensen.

Dit proefschrift beschrijft verder de resultaten van humaan interventieonderzoek en *in vitro* experimenten naar de effecten van zuivelproducten en -bestanddelen op verschillende metabole risicofactoren die geassocieerd zijn met het metabool syndroom. In onze eerste interventiestudie, beschreven in **hoofdstuk 3 en 4**, hebben we de effecten van zuivelconsumptie op metabole risicoparameters bestudeerd bij mensen met overgewicht. Vijfendertig gezonde proefpersonen met overgewicht consumeerden in willekeurige volgorde 8 weken lang dagelijks 500 ml halfvolle melk en 150 g halfvolle yoghurt, of 600 ml vruchtensap en 3 vruchtenbiscuits. De plasma concentratie van 1,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> was lager na de zuivelperiode dan na de controleperiode, hetgeen laat zien dat de deelnemers de experimentele producten hebben gebruikt. De systolische bloeddruk daalde met 2.9 mmHg na zuivelconsumptie, terwijl de diastolische bloeddruk niet significant veranderde. Verder verlaagde zuivelconsumptie de concentratie van HDL-cholesterol en apoA-1. Er waren geen verschillen in totaal cholesterol, LDL-cholesterol, apoB, triglyceriden, vrije vetzuren, glucose, insuline, CRP en PAI-1. We hebben ook de effecten van zuivel op een aantal inflammatoire eiwitten en adhesiemoleculen bestudeerd. Zuivelconsumptie beïnvloedde de TNF- $\alpha$  pathway door verhoging van de s-TNFR-2 con-

concentratie. Ook was er een trend tot verhoogde s-TNFR-1 en verlaagde TNF- $\alpha$  concentraties. De fysiologische gevolgen van deze veranderingen zijn niet helemaal duidelijk. Uit deze resultaten kunnen we echter concluderen dat de consumptie van zuivelproducten de systolische bloeddruk verlaagt, maar dat het verder geen gunstige effecten heeft op andere metabole risicofactoren bij mensen met overgewicht.

Naast de langetermijneffecten, waren we ook geïnteresseerd in de postprandiale effecten van zuivelproducten. Postprandiale hyperlipidemie en hyperglycemie zijn namelijk ook risicofactoren voor hart- en vaatziekten en tegenwoordig bevinden mensen in de Westerse wereld zich gedurende het grootste gedeelte van de dag in de postprandiale fase. Postprandiale hyperlipidemie en hyperglycemie komen vaak voor bij mensen met het metabool syndroom. In onze postprandiaalstudie hebben we gekeken naar de effecten van het toevoegen van melk en de melkbestanddelen calcium en eiwit aan een vetrijke maaltijd (**hoofdstuk 5**). Zestien gezonde proefpersonen met overgewicht ondergingen 4 postprandiaaltesten, waarin ze een vetrijk ontbijt consumeerden en 500 ml van een controle-, calcium-, eiwit-, of melkdrank. Uit de resultaten blijkt dat melk en eiwit de triglyceridenrespons na de vetrijke maaltijd verhoogden. Verder verlaagden melk en eiwit de maximale stijging in glucoseconcentratie. De respons in vrije vetzuren was niet verschillende tussen de interventies, terwijl de insulinerespons verhoogd was na de melk-maaltijd. Calcium had geen effect op de postprandiale responsen. We concluderen hieruit dat het toevoegen van melk aan een vetrijke maaltijd tegengestelde effecten heeft op het postprandiale risicoprofiel, omdat het triglycerideconcentraties verhoogt en glucoseconcentraties verlaagt.

In **hoofdstuk 6** zijn de *in vitro* experimenten beschreven, waarin we hebben gekeken naar de effecten van de aminozuren glutamine, leucine en proline op inflammatie en insulinegevoeligheid in HepG2 levercellen. De cellen werden behandeld met IL-1 $\beta$  om een inflammatoire respons op gang te brengen. Het incuberen van de cellen met aminozuren verminderde de productie van het proinflammatoire cytokine IL-8 en de activiteit van de transcriptiefactor NF- $\kappa$ B. Om de invloed van aminozuren op insulinegevoeligheid te bestuderen, werden de cellen eerst geïncubeerd met TNF- $\alpha$ . Hierdoor werden de cellen insulineresistent en werd de fosforylering van Akt, door insuline, geremd. Wanneer we echter aminozuren aan het medium toevoegden, werd de fosforylering van Akt hersteld. Deze resultaten lijken veelbelovend, maar er is verder onderzoek nodig om te bepalen wat de invloed van aminozuren op inflammatie en insulinegevoeligheid is in de *in vivo* situatie.

De resultaten van de studies beschreven in dit proefschrift kunnen de bevindingen van observationeel onderzoek, die een negatieve relatie tussen zuivelconsumptie en het metabool syndroom lieten zien, niet geheel bevestigen. Onze eerste interventiestudie liet zien dat het 8 weken lang consumeren van 500 ml melk en 150 g yogurt per dag de systolische bloeddruk verlaagde, maar dat het tevens het HDL-cholesterol reduceerde. Verder lijkt zuivelconsumptie een effect te hebben op de



TNF- $\alpha$  pathway. Onze celexperimenten gaven indicaties voor gunstige effecten van aminozuren op insulinegevoeligheid, maar dit bleek niet uit de nuchtere glucose- en insulineconcentraties in onze interventiestudie. Uit de resultaten van onze post-prandiaalstudie bleek wel dat het toevoegen van melk aan een vetrijke maaltijd de stijging in plasma glucosewaarden vermindert. Tegelijkertijd verhoogde melk de triglyceriden- en insulineresponse. Het eiwit uit de melk lijkt hier grotendeels verantwoordelijk voor te zijn. Verder onderzoek moet aantonen of deze resultaten ook gelden voor andere zuivelproducten, andere hoeveelheden, of andere populaties.